第2卷第4期 动物学研究 Vol.2, No.4
1981年11月 ZOOLOGICAL RESEARCH Nov., 1981

眼镜王蛇(*Ophiophagus hannah*)蛇毒四个神经毒组份的纯化和某些性质的研究

孙 欣 杨长久 陈锡兰
(中国科学院昆明动物研究所)

雷克健
(中国科学院生物物理研究所)

摘 要

根据前文报导的方法（蔡景霞等人，1980），用羧甲基纤维素葡聚糖凝胶C25分离我国广西眼镜王蛇(Ophiophagus hannah)蛇毒，获得十七个蛋白组份。其中组份7、8、9和11蛋白回收率比较高，且具有明显的抗去极化神经肌肉阻遏作用。

由于它们还含有磷酸单酯酶，磷酸二酯酶，5′—核苷酸酶和核糖核酸酶等酶活性，我们进一步用羧甲基纤维素CM32和葡聚糖凝胶G50纯化了组份7、8、9和11。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定，它们均为单一条带，且具有神经肌肉阻遏作用，没有磷酸单酯酶等酶活性。随后测定了它们的氨基酸组成和N—末端氨基酸。根据离体大白鼠膈神经膈肌标本和去神经大白鼠膈肌标本实验和氨基酸组成测定结果表明，眼镜王蛇毒似乎既含长链神经毒也含短链神经毒，它们的作用部位是在神经肌肉突触后膜，对突触前膜没有影响，都是突触后神经毒素。

引 言

蛇毒神经毒的研究已相当广泛，它们在神经肌肉传递、乙酰胆碱受体和蛇伤防治研究等方面已受到许多学者的重视。尤其眼镜蛇科毒蛇蛇毒含有丰富的神经毒，按其作用方式可分为突触前神经毒和突触后神经毒。后者按其肽链长短又可分为长链神经毒（71—74个氨基酸残基和五对二硫键）和短链神经毒（60—62个氨基酸残基和四对二硫键）。它们被认为是眼镜蛇科毒蛇咬伤的主要致死成分(Lee, 1972)。眼镜王蛇属于眼镜蛇科王蛇属，是目前已知的最大有毒蛇，排毒量大，为我国南方所常见。一方面危害严重，另

本文于1980年12月18日收到。

一方面却为蛇毒资源利用提供了丰富的来源。但至今对眼镜王毒蛇研究不多。1973年南非的 Joubert 报导了从泰国眼镜王蛇毒用羧甲基纤维素CM52和葡聚糖凝胶G50分离得两个长链神经毒，即毒素 a 和毒素 b，发现它们的氨基酸组成和顺序排列十分类似于 α 银环蛇毒素（α—bungarotoxin）等长链神经毒。但未见生理活性的测定。1980 年蔡景霞等人报导了用羧甲基葡聚糖凝胶C25 分离我国广西眼镜王蛇毒，获得了十七个蛋白组份。发现七个毒性较高的组份，其中六个组份具有神经肌肉阻遏作用。但它们还显示有几种酶活力，聚丙烯酰胺凝胶电泳显示两条以上的带。为了进一步研究其神经毒组份的生物学性质，我们对 7 、8 、9 和11四个蛋白回收率较高的神经毒组份应用羧甲基纤维素 CM32 和葡聚糖凝胶 G50 进行了纯化，并对纯化组份进行了氨基酸组成和 N—末端氨基酸测定、现将结果报导如下。

材料和方法

蛇毒：眼镜王蛇毒系1979年采自我国广西省，经冷冻干燥制成干粉备用。

羧甲基葡聚糖凝胶 C 25柱层析：按蔡景霞等人叙述的方法进行柱层析分离，分别合并神经毒组份 7 、 8 、 9 和11。葡聚糖凝胶 G 10（瑞典pharmacia 产品）柱层析脱盐、冷冻干燥备用。

葡聚糖凝胶 G 50凝胶过滤：组份 7 、 8 、 9 和11冷冻脱盐干粉溶于 5 毫升0.05M醋酸钠缓冲液（pH5.8）中，进行葡聚糖凝胶 G 50凝胶过滤，柱高60厘米，直径2.5厘米。流速为每小时12毫升，脱盐冷冻干燥备用。

羧甲基纤维素CM32重层析：羧甲基纤维素CM32用0.05M醋酸钠缓冲液（pH5.8）平衡，装入30×1.5厘米柱中，经过葡聚糖凝胶 G 50的组份 7 、 8 、 9 和 11之脱盐冷冻干粉分别溶于上述缓冲液中上柱，用 0—0.2M 连续氯化钠线性梯度洗脱，总洗脱液为 600 毫升，流速为每小时12—14毫升，用同样方法脱盐和冷冻干燥。组份 9 和11重层析后再经葡聚糖凝胶 G 50进行一次凝胶过滤。

聚丙烯酰胺凝胶电泳：采用酸性电泳系统（莽克强等，1975），聚丙烯酰胺凝胶浓度为15%，电极缓冲液pH4.3，考马斯亮蓝染色，7 %醋酸脱色。

酶活性测定：参照涂光俦等人（1976）的方法测定了各组份中磷酯酶 A，磷酸单酯酶，磷酸二酯酶，5′—核苷酸酶，核糖核酸酶，L—氨基酸氧化酶，蛋白水解酶，乙酰胆碱酯酶和精氨酸酯酶等几种酶活性。

神经肌肉阻遏作用的分析：

大白鼠离体膈神经膈肌标本按常规方法制备，将标本置于盛有台氏液的双层水溶槽内，溶液温度维持在32°C，并通以氧气。用0.5毫秒超强方波每10秒交替刺激神经和肌肉。膈肌对间接刺激和直接刺激引起的收缩记录于烟鼓上。台氏液中各纯化组份浓度均为每毫升 5 微克，粗毒为10微克。

去神经离体大白鼠膈肌标本：在戊巴比妥钠（30 毫克／公斤体重）腹腔注射麻醉状态下，切断右侧膈神经，九天到两周后取出右侧膈肌，悬浮在32°C通以氧气的台氏溶液中，0.5毫秒超强方波直接刺激肌肉、刺激频率为每分钟 6 次，在加入乙酰胆碱反应

期间停止刺激，待乙酰胆碱与腸肌接触30秒后，立即洗去。

氨基酸组成和N—末端氨基酸测定：纯化组份7—A，8—B，9和11以含1％苯酚，10％巯基乙酸的5.7N重蒸三次恒沸盐酸，抽气封管于105—110°C，水解24小时，水解样品经日立（Hitachi）835型氨基酸分析仪上分析（D. Brandenburg，雷克健等，1980）。胱氨酸测定按Hirs方法（1967），将样品经过甲酸处理后，在氨基酸分析仪上测定，按半胱磺酸数进行计算。纯化组份的N—末端氨基酸用FDNB法测定，聚酰胺薄膜鉴定末端DNP氨基酸，展开系统为Ⅰ，苯∶冰醋酸＝8∶2；Ⅱ，甲酸∶水＝1∶1。

结　果

酶活力测定：羧甲基葡聚糖凝胶C25分得十七个组份中，酶活性分布是：碱性磷酸单酯酶主要分布在组份1、7和8；碱性磷酸二酯酶主要集中在组份7；L—氨基酸氧化酶和磷脂酶A主要集中在组份1；核糖核酸酶主要分布在组份9和10；5′—核苷酸酶

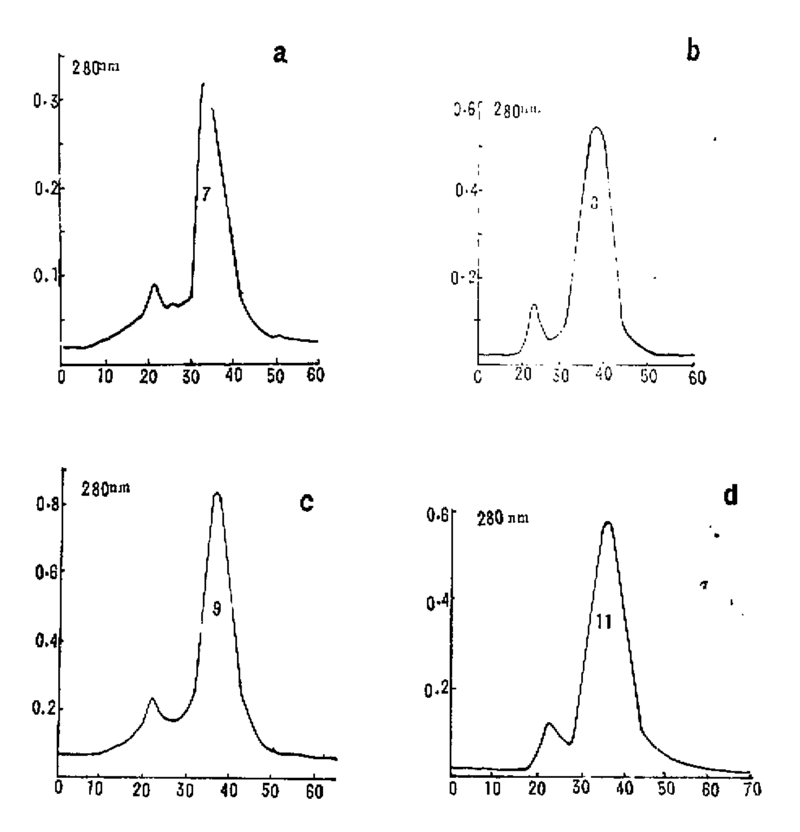


图1　眼镜王蛇毒神经毒组份7、8、9和11的葡聚糖凝胶G50（2.5×60厘米）的凝胶过滤

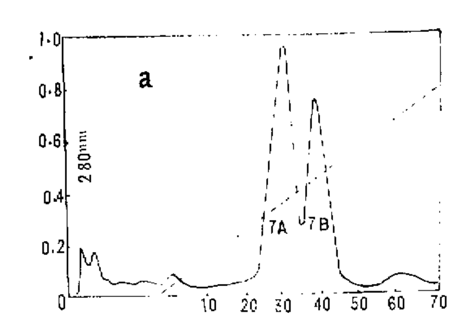
a）组份7（10.2mg）；　b）组份8（22.1mg）；　c）组份9（30.8mg）；　d）组份11（18.8mg）。

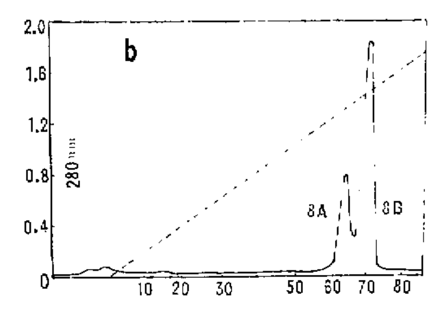
说明见正文

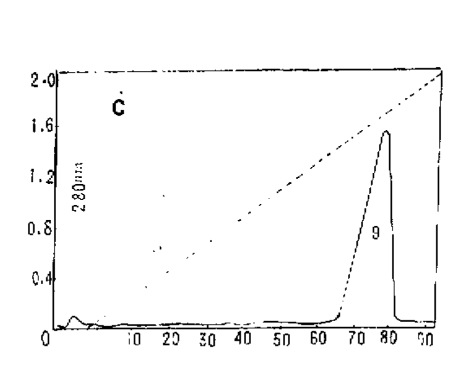
主要分布在组份9、10和11，蛋白水解酶、乙酰胆碱酯酶和精氨酸酯活力较低，在各分离组份中未能检测出来。

组份7、8、9和11的纯化：

组份7、8、9和11经葡聚糖凝胶G50凝胶过泸后，均只出现一个主峰(见图1a，b，c，d)，各主峰经羧甲基纤维素CM重层折后，组份7和8各分为两个峰（图2a，2d），组份9和11只出现一个主峰（图2c，2d）。组份7—A和7—B的蛋白回收率分别为39·7%和29·4%；组份8—A和8—B分别为15.1%和49.1%；组份9和11分别为65·6%和81·0%。纯化组份7—A，8—B、9和11毒性较高、蛋百回收率也高，都具有神经肌肉阻遏作用（见图4a）。除组份11仍显示一定的5′—核苷酸酶活性外，其余纯化组份均不显示磷酸单酯酶等九种酶活性，组份11经酸变性处理后与组份9分别经葡聚糖凝胶G50再层析，结果见图3a，b。各纯化组份7—A、8—B、9







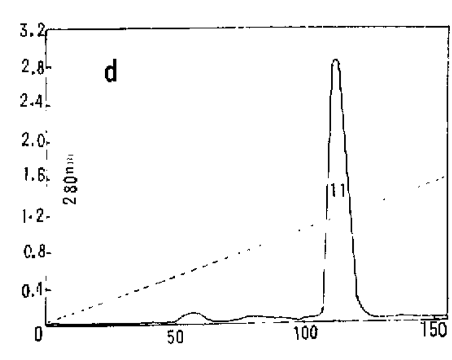


图2　眼镜王蛇毒神经毒组份7、8、9和11的羧甲基纤维素CM32重层析图(说明见正文)

a)，组份7(63mg)；　b)，组份8(50mg)；　c)，组份9(74mg)；　d)，组份11(58mg)。

表 1　　眼镜王蛇毒组份7—A、8—B、9和11的氨基酸组成和N—端

氨基酸名称	7—A		8—B		9		11	
	氨基酸残基最小整数	残基数/100个残基数	氨基酸残基最小整数	残基数/100个残基数	氨基酸残基最小整数	残基数/100个残基数	氨基酸残基最小整数	残基数/100个残数数
赖氨酸	5	8.07	4	7.55	6	6.81	8	11.11
组氨酸	2	3.23	1	1.89	0	0	1	1.38
精氨酸	2	3.23	1	1.89	4	5.26	3	4.17
天门冬氨酸	6	9.68	6	11.32	8	10.53	10	13.90
苏氨酸	7	11.29	2	3.77	9	11.84	7	9.72
丝氨酸	2	3.23	5	9.43	3	3.95	4	5.56
谷氨酸	5	8.07	2	3.77	5	6.58	2	2.78
脯氨酸	5	8.07	4	7.55	7	9.21	7	9.72
甘氨酸	5	8.07	4	7.55	4	5.26	4	5.56
丙氨酸	2	3.23	3	5.66	4	5.26	2	2.78
缬氨酸	3	4.84	2	3.77	6	7.89	4	5.56
甲硫氨酸	2	3.23	0	0	1	1.32	0	0
异亮氨酸	3	4.84	3	5.66	3	3.95	4	5.56
亮氨酸	2	3.23	3	5.66	1	1.32	1	1.38
酪氨酸	1	1.61	0	0	2	2.63	2	2.78
苯丙氨酸	1	1.61	4	7.55	2	2.63	2	2.78
1/2胱氨酸	8	12.90	7	13.21	8	10.53	10	13.90
色氨酸	1	1.61	2	3.77	3	3.95	1	1.38
总残基数	62		53		76		72	
N—端	2				苏氨酸			

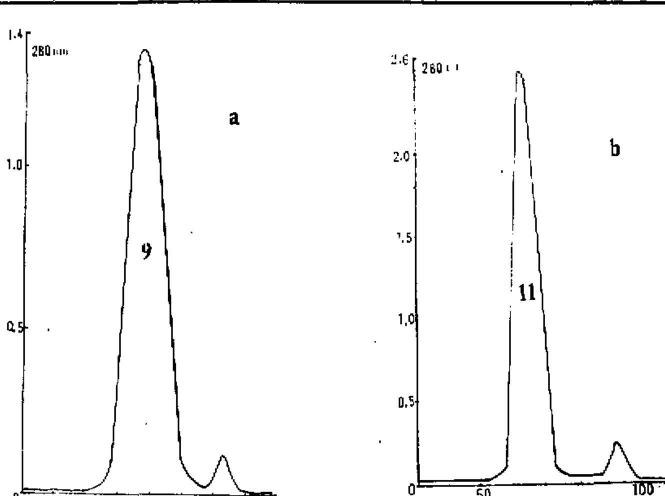


图 3　眼镜王蛇毒神经毒组份 9 和11的葡聚糖凝胶G50(2.5×60厘米)的凝胶过滤。

a)，组份 9 (42mg)；　　b)，组份11(55mg)。

和11的聚丙烯酰胺凝胶电泳均只呈现一条带（图 5 ）。从离体大白鼠膈神经膈肌标本和去神经大白鼠膈肌标本实验结果表明（图 4 a， 4 b），它们都能造成抗去级化型的神经肌肉阻遏作用，作用部位在神经肌肉突触后膜。对肌肉本身均无影响。

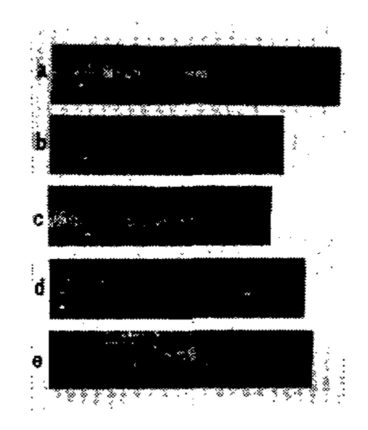


图4a　眼镜王蛇毒及其纯化的神经毒组份—7 A，8 — B，9 和11对大白鼠膈神经膈肌标本的阻遏作用。（△为毒素加入处）

a)，粗毒(10μg/ml)； b)，7 —A(5 μg/ml)，
c)，8 —B(5μgml)　d) 9 (5μg/ml)；　e)，11(5μg/ml)

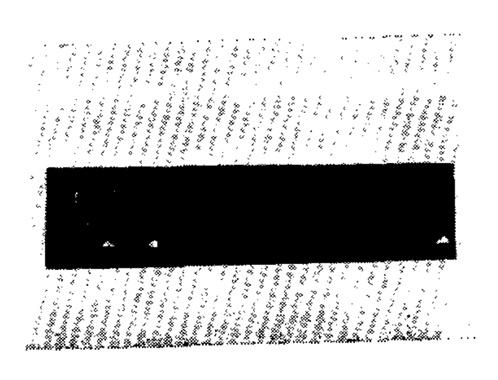


图4b　眼镜王蛇毒对去神经大白鼠膈肌乙酰胆碱敏感性的影响。
（△为加入Ach处，10μg/ml；□为加入毒素处，10μg/ml)

纯化组份 7 — A、 8 — B、 9 和11的氨基酸组成和N—末端氨基酸测定：

四个纯化神经毒组份 7 — A、 8 — B， 9 和11的氨基酸组成和部分 N—末端氨基酸测定结果见表 1 ，由表 1 可见，它们均含有较高的碱性氨基酸和一定数量的疏水氨基酸（如丙氨酸，苯丙氨酸），半胱氨酸含量也比较高，脯氨酸含量高而亮氨酸含量低，通过计算，纯化组份 7 — A、 8 — B， 9 和11的氨基酸残基酸分别为62、53、76和72个。组份 9 的N—末端为苏氨酸。

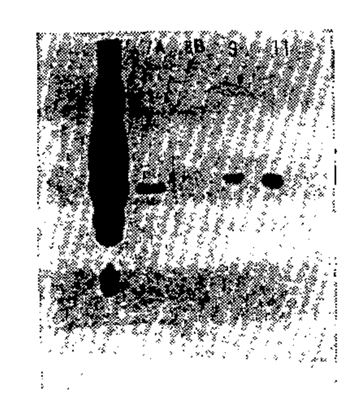


图 5　睛镜王蛇毒及其纯化的神经毒组份 7 — A，8 — B，9 和11的聚丙烯酰胺凝胶电泳

讨　论

经羧甲基葡聚糖凝胶C25分离我国广西眼镜王蛇毒，获得十七个蛋白组份，六个组份显示神经肌肉阻遏作用。其中纯化得到了四个神经毒组份，这与Joubert报导的从泰国眼镜王蛇毒中仅分出毒素 a 和毒素 b 两种神经毒组份显著不同。

通过大白鼠膈神经膈肌标本和去神经大白鼠膈肌标本实验表明，纯化组份 7 —A，8 —B，9 和11都能消除由间接刺激引起肌肉收缩作用而不能消除由直接刺激引起的肌肉收缩作用，并且眼镜王蛇毒在造成神经肌肉阻遏后，去神经大白鼠膈肌标本对乙酰胆碱反应即完全消除。提示眼镜王蛇毒及其四个纯化神经毒组份的作用部位在神经肌肉突触后膜，即它们跟 α 银环蛇毒素（α—bungarotoxin）一样，都是突触后神经毒素。

眼镜王蛇毒不但含有大量的突触后神经毒素，而且磷酸二酯酶和 L—氨基酸氧化酶含量很丰富，分布很集中，是开展上述两种酶利用的好材料。

从氨基酸组成分析可以看出，组份 7 —A、8 —B、9 和11的半胱氨酸含量显著高于一般蛋白、这就为它们分子形成较多的二硫键提供了条件，从而决定了它们分子的热稳定性。

同时四个纯化神经毒组份的碱性氨基酸和酸性氨基酸都较高，并且组份 8 和11较组份 7 —A，8 —B 的高，这与已知蛇毒神经毒一致，亦为碱性多肽。相当数量的谷氨酸，天门冬氨酸是呈酰胺形式存在的。纯化组份的脯氨酸含量显著高于一般蛋白，因脯氨酸是破坏二级结构的，而亮氨酸等形成螺旋结构的残基少，所以可以预期这四个纯化神经毒组份的螺旋法结构较少。

四个神经毒组份都含有一定数量的疏水氨基酸。Lee（1972）的认为，长链神经毒均含疏水氨基酸，而短链神经毒则没有。前者与突触后膜结合相对不可逆，这是因为它们含有疏水氨基酸残基的缘故。但从氨基酸组成分析发现，组份 7 —A，8 —B 似乎是短链的、而组份 9 和11则是长链的，尤为奇怪的是组份 8 —B 只有53个氨基酸残基，其中只 7 个半胱氨酸残基，是目前蛇毒神经毒中未见的，尚需进一步加以证实。从我们初步结果看来，眼镜王蛇毒似乎既含长链神经毒也含短链神经毒，在开展胆碱能受体的研究中，眼镜王蛇毒长链神经毒有可能与 α 银环蛇毒素具有同样的作用。

参 考 文 献

蔡景霞等　1980　眼镜王蛇蛇毒的柱层析分离及神经毒组份的研究　动物学研究 1:319——225。

莽克强等编　1975　聚丙酰胺凝胶电泳 科学出版社　P 43——48。

涂光俤等　1976　我国几种常见毒蛇蛇毒酶活力的测定　生物化学与生物物理学报 8:151——156。

Brandenburg, D., 雷克健等　结晶猪、牛B_1色氨酸胰岛素的制备及性质 中国科学 10:995——1003。

Hirs, C. H. W. 1967 Performic acid oxidation in methods in enzymology XI P197 Ed. by Hirs, C.H. W. Academic Press New York.

Joubert, F. J. 1973 Snake venom toxins: The amino acid sequences of two toxins from *Ophiophagus hannah* (King cobra) venom. *Biochimica et Biophysica Acta* 317:85—98.

Lee, C. Y. 1972 Chemistry and pharmacology of polypeptide toxins in snake venoms, *Ann. Rew. Pharmac*, 12:265—281,

PURIFICATION AND PROPERTIES OF FOUR NEUROTOXIC FRACTIONS FROM THE VENOM OF *Ophiophagvs hannah*

Sun Xin, Yang Changjiu and Chen Xilan

(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

Lai Kejian

(Institute of Biophysics, Academia Sinica)

Abstract

From the venom of *O. hannah*, seventeen fractions had been isolated by column chromatography on CM-sephadex C25 as previously described. Among the seventeen fractions, fractions 7, 8, 9 and 11 produced an antidepolarizing neuromuscular block. But they were contaminated with phosphomonoesterase, phosphodiesterase, 5′-nucleotidase and ribonuclease. After re-chromatography on CM32 and gel filtration on sephadex G50, 7—A, 8—B, 9 and 11 were confirmed to be homogenous by polyacrylamide gel electrophoresis. That si to say, they were free from phosphomonoesterase, etc. We determined the amino acid compositions and N-terminal groups of the four purified fractions. The experiment on rat phrenicdiaphragm and denerved rat diaphragm preparations in vitro and the determination of amino acid compositions suggested that *O. hannah* venom contained both long neurotoxins and thort ones. The site of action was found to be in the postsynapse instead of the in the presynapse.